

実験的腹腔内感染における腹水中 β -lactamase 活性の測定

—腹水中生菌数および薬剤濃度との比較検討—

道 浦 準・谷 村 弘・坂 本 幸 具

和歌山県立医科大学消化器外科*

(平成3年7月15日受付・平成3年10月9日受理)

Escherichia coli と *Bacteroides fragilis* をマウスの腹腔内に接種して実験的腹腔内感染を作成し, sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), ampicillin (ABPC), sulbactam (SBT), piperacillin (PIPC) の治療効果を検討し, 腹水中 β -lactamase 活性, 生菌数, 薬剤濃度を感染後の時間を追って測定した。その結果,

1) ED₅₀ は SBT/ABPC が 14 mg/kg, ABPC が 23 mg/kg であったが, SBT と PIPC は 70 mg/kg の投与においても半数のマウスを救命できなかった。

2) 腹腔内感染に対し治療を行わないと腹水中 β -lactamase 活性は penicillinase (PCase), cephalosporinase (CSase) とも感染後3時間でプラトーに達した。これに対し, SBT 30 mg/kg の投与では菌数の減少は見られなかったものの β -lactamase 活性は強く阻害され, CSase において一層顕著であった。

3) 腹水中薬剤濃度は腹腔内感染時にはいずれの薬剤も非感染時より 10 倍高かった。

4) ABPC や PIPC の最高腹水中濃度は 2 回目投与後では 1 回目の約半分であったのに対し, SBT/ABPC では ABPC 濃度は 1 回目, 2 回目ともほとんど差がなかった。

以上の結果, SBT/ABPC の治療効果は腹水中における β -lactamase 阻害効果に基づくものが大きく, β -lactamase は間接的病原性の原因の 1 つであると言える。

Key words: β -lactamase 活性, 腹水, acidimetry 法, マウス実験的腹腔内感染

近年, β -lactam 剤を主体とする各種の広域スペクトラム抗菌薬の開発に伴い, 外科感染症における薬物療法は大きな発展を果たした。外科領域感染症では, 消化管内の常在菌を反映して多岐にわたる穿孔性腹膜炎からの検出菌のうち, *Bacteroides fragilis* group の多くの株は β -lactamase を産生するため, β -lactamase による水解に抵抗性でかつ広域な抗菌スペクトラムを誇る新世代セフェムが治療薬として好んで用いられてきた。

しかし, 抗菌薬の適切な使用とは, 確立された固定の治療法ではなく, 薬剤の組織移行を考慮した上で, 患者の状態や治療への反応を迅速に捉えつつ絶えず変化する局面に応じた的確な抗菌薬の投与を意味する¹⁻³⁾。

我々は穿孔性腹膜炎をモニターする手技の 1 つとして, Acidimetry 法^{4,5)}を用いるヒト腹水中の β -lactamase 活性測定法を確立し, 臨床への応用を試みてきた⁶⁾。

今回は, マウスを用いて実験的に腹腔内感染モデルを作成し, 腹腔内菌数と腹水中 β -lactamase 活性の変化を未

治療群と sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), ampicillin (ABPC), sulbactam (SBT), piperacillin (PIPC) 投与群とに分けて検討を行い, 興味ある知見を得たので報告する。

I. 材料と方法

1. 実験動物

ICR 系雄性マウス 4 週齢, 体重 28.1 ± 1.7 g を用いた。1 群 10 匹ずつをプラスチックケージ内で飼育し, 餌と水は自由に摂取させた。

2. 使用菌株

腹腔内接種菌は, 臨床分離株のうち敗血症由来の *Escherichia coli* PT-23 および腹膜炎の腹水由来の *B. fragilis* PT-84 を用いた。 β -lactamase 産生能を nitrocefin disk 法および acidimetry disk 法 (β チェック, ファイザー製薬) で調べた結果では, *E. coli* PT-23 は nitrocefin disk 法のみ陽性, *B. fragilis* PT-84 は nitrocefin disk, acidimetry disk 法 2 種 (Pen-

* 和歌山市 7 番町 27

icillin G disk, Cephazolin disk) とも陽性であった。

3. 実験的マウス腹腔内感染

E. coli は Heart Infusion 寒天斜面培地 (日水) で、 37°C 、20 時間培養後滅菌生理食塩液に浮遊させた。*B. fragilis* は GAM broth (日水) にて 37°C 、20 時間培養した。これらの菌液を新鮮 GAM broth で希釈し、*E. coli* は 4.4×10^8 cfu/ml、*B. fragilis* は 7.8×10^8 cfu/ml となるように調整し、等量混合してその 0.5 ml (菌量として *E. coli* 2.2×10^8 cfu/mouse、*B. fragilis* 3.9×10^8 cfu/mouse) をマウス腹腔内へ接種し感染を成立させた。

4. 薬剤投与と薬剤濃度測定

投与した薬剤は ampicillin (ABPC, 909 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、力価、ファイザー製薬)、sulbactam (SBT, 890 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、ファイザー製薬)、piperacillin (PIPC, 859 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、富山化学) および SBT と ABPC を力価比 1:2 に混合した SBT/ABPC の 4 剤で、感染後 1 時間および 4 時間の 2 回、マウスの背部に皮下注射した。

感染マウスと非感染マウスを用いて各薬剤 30 mg/kg を皮下投与した際のマウス腹水中薬剤濃度を測定した。1 回目、2 回目とも薬剤投与後 0.5 時間、1 時間および 2 時間 (感染後 1.5 時間、2 時間、3 時間、4.5 時間、5 時間、6 時間) に腹腔正中を穿刺し、滅菌した 0.4 mM リン酸塩緩衝生理食塩液 2 ml を注入、丹念にマッサージを行い洗浄した。ついで、左右側腹部を穿刺回収し、4 匹分をプールして 0.45 μm のミリポアフィルターを通して薬剤濃度測定用の腹水試料とした (以降、腹腔洗浄後の回収液を腹水と略す)。なお、薬剤濃度測定用の腹水は、 β -lactamase による薬剤不活を停止させるために 99% のメタノールを等量添加した後、 -20°C で凍結保存した。

SBT 濃度は HPLC 法⁷⁾で、ABPC と PIPC 濃度は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とする bio-assay 法^{8,9)}で定量した。各薬剤の検出限界は SBT が 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ABPC が 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、PIPC が 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

薬剤濃度測定用の実験とは別に、薬剤投与後のマウスの観察を 5 日間行い、ED₅₀ 値を Probit 法により算出した。

5. 腹水中 β -lactamase 活性測定と生菌数測定

同様に感染後 0.5 時間、1.5 時間、2 時間、3 時間、4.5 時間、5 時間、6 時間に、感染マウス 5 匹分の腹水を集め、 β -lactamase 活性測定および生菌数測定を行った。

β -lactamase 活性の測定は教室の坂本¹⁰⁾の方法に

準じ、Acidimetry 法^{4,5)}で行った。すなわち、ミリポアフィルター処理した腹水をあらかじめ pH 7.60 に調整した 0.4 mM リン酸塩緩衝液で希釈した。さらに 0.01 N の NaOH または HCl で正確に pH 7.60 に微調整した後、分光光度計用石英セルにそれぞれ 2.3 ml 分注し、フェノールレッド溶液を 0.1 ml 添加し反応溶液とした。対照には緩衝液 0.1 ml を、反応系には最終濃度が 0.05 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ となるように HCl 0.1 ml を加えて、pH 指示薬として加えておいたフェノールレッドの色調の変化を 558 nm における赤色の吸光度の低下としてダブルビーム型分光光度計 (日本分光, Ubest-50) で測定し、1 OD の低下が何 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の HCl に相当するかを判定した。

同様に、反応系に基質として ABPC あるいは cephaloridine (CER, Sigma) を 0.1 ml (最終濃度 0.2 mM)、また対照には 0.1 ml の緩衝液を加えた (Fig. 1)。この際、ABPC または CER が腹水に含まれる β -lactamase により分解されると、1 個または 2 個の H⁺ を放出し、これがフェノールレッドの色調

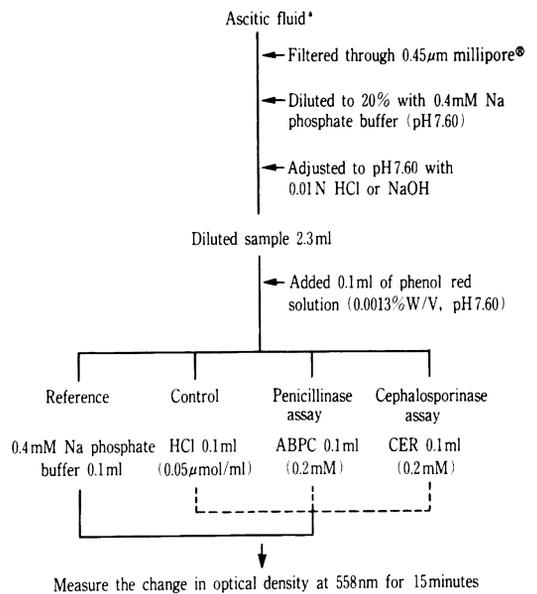


Fig. 1. Assay procedure of β -lactamase activity in ascitic fluid^a by the acidimetric method. ABPC: ampicillin; CER: cephaloridine.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse. After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid.

を赤色から黄色に変化させることを利用し、558 nm における吸光度の低下を反応開始後 15 分間、経時的に 1 分間隔で測定し、 β -lactamase 活性を算出した。なお、 β -lactamase の 1 活性単位 (U: Unit) は国際基準に従い、1 分間に 1 μ mol の基質を分解する酵素活性とした。ミリポアフィルター処理をしなかった腹水を用いて滅菌 GAM broth で 10 倍段階希釈系列を作成、各段階希釈液の 0.1 ml ずつを DHL 寒天培地 (栄研) および BBE 寒天培地 (極東) 各 3 枚ずつに拡げた。35°C、24 時間それぞれ好気、嫌気培養した後、コロニー数に希釈度を乗じて生菌数を求めた。

6. 薬剤感受性測定

日本化学療法学会標準法¹¹⁾に準じ、Mueller-Hinton 寒天培地 (Difco) および GAM 寒天培地 (日水) を用いて寒天平板希釈法により測定した。また嫌気培養は Anaerobic system (Forma 社) 内で行った。

II. 結 果

1. マウス腹腔内感染モデルにおける抗菌薬の治療効果

B. fragilis と *E. coli* による腹腔内混合感染モデルにおける SBT/ABPC, ABPC, SBT, PIPC の *in vivo* 効果および感染菌に対する 4 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を Table 1 に示した。

β -lactamase を高度に産生する *B. fragilis* は ABPC, PIPC に耐性を示したのに比し、SBT/

ABPC は MIC 6.25 μ g/ml (10⁶cfu/ml 接種時) と良好な抗菌力を示した。

E. coli は ABPC と PIPC に感受性を示し、SBT と ABPC の相乗効果を認めなかった。

マウス感染モデルでの SBT/ABPC の ED₅₀ は 14.0 mg/kg であり、ABPC 換算量として 9.3 mg/kg, SBT 換算量として 4.7 mg/kg であった。ABPC 単独投与での ED₅₀ は 23.3 mg/kg を示した。SBT と PIPC は 70 mg/kg の投与においても過半数のマウスを救命し得なかった。

2. マウス腹水中薬剤濃度

感染時と非感染時のマウスの腹水中薬剤濃度を Table 2 に示した。感染時の薬剤濃度はいずれの薬剤においても非感染時よりも 10 倍高い値であった。

SBT/ABPC と ABPC を比較すると、ABPC 単独投与のほうが総投与量が 1.5 倍であったにもかかわらず、感染後 2 時間と 5 時間では SBT/ABPC 投与のほうが ABPC 単独投与よりも ABPC 濃度が高かった。また、1 回目と 2 回目の投与後 0.5 時間で薬剤濃度を比較すると、SBT/ABPC 投与では ABPC 濃度はほぼ等しいのに対し、他の 3 薬剤の単独投与では 2 回目投与後の腹水中濃度が、1 回目よりも低値となった。

3. 腹水中生菌数と β -lactamase 活性の変化

未治療群および SBT, SBT/ABPC, ABPC, PIPC をそれぞれ 30 mg/kg 投与した群における腹水

Table 1. Protective effect of four antibiotics on mice experimental infection with *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli*

Antibiotic	Challenge dose (cfu/mouse)		MIC (μ g/ml)				ED ₅₀ (mg/kg)
	<i>B. fragilis</i> PT-84	<i>E. coli</i> PT-23	<i>B. fragilis</i> PT-84		<i>E. coli</i> PT-23		
			10 ⁶ cells/ml	10 ⁶ cells/ml	10 ⁶ cells/ml	10 ⁶ cells/ml	
SBT/ABPC			25	6.25	1.56	0.78	14.0 (9.46-19.4)
ABPC	3.9×10 ⁸	2.2×10 ⁸	400	200	0.78	0.39	23.3 (15.5-28.5)
SBT			100	25	50	25	71.2
PIPC			400	100	0.78	0.39	71.2

Antibiotics were administered subcutaneously twice at 1 and 4 hours after infection.

ED₅₀ value is expressed as a single dose.

Number in parentheses at ED₅₀ values indicate 95% confidence limits.

SBT/ABPC: a combination of sulbactam and ampicillin at a ratio of 1:2

ABPC, ampicillin; SBT; sulbactam; PIPC, piperacillin.

MICs and ED₅₀ of SBT/ABPC are shown as total β -lactams.

Table 2. Comparative drug concentrations in ascitic fluid^a after subcutaneous administration of antibiotics in infected and uninfected mice

Antibiotic		Concentration ($\mu\text{g/ml}$)/Time after infection							
		1 h	1.5 h	2 h	3 h	4 h	4.5 h	5 h	6 h
(Administration point) \rightarrow		○	○						
SBT/ABPC (1:2)	(infected ^b)		2.0	0.6	*		1.2	0.9	*
	(uninfected ^c)		*	*	*		*	*	*
ABPC	(infected ^b)		4.2	2.5	0.4		4.1	2.8	0.6
	(uninfected ^c)		0.4	0.2	*		0.4	0.2	*
SBT	(infected ^b)		5.3	2.0	0.3		3.8	1.4	0.2
	(uninfected ^c)		0.3	*	*		0.3	*	*
PIPC	(infected ^b)		2.9	0.4	*		1.6	0.4	*
	(uninfected ^c)		*	*	*		*	*	*

* not detected

Each antibiotic was administered subcutaneously at a dose of 30 mg/kg twice at 1 and 4 hours after infection.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse.

After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid.

^b Mice were infected intraperitoneally with and *B. fragilis* PT-84 *E. coli* PT-23.^c Normal mice were used.

中の生菌数と β -lactamase 活性の経時的変化を Figs. 2~6 に示した。

まず、治療を行わない場合における腹水中生菌数をみると、感染後いったん *E. coli* も *B. fragilis* もそれぞれ 6.4×10^7 cfu/ml, 2.3×10^7 cfu/ml に減少したが、3時間後には 1.0×10^8 cfu/ml, 2.0×10^8 cfu/ml と増加に転じ、6時間後には 4.0×10^8 cfu/ml, 9.7×10^7 cfu/ml となった。腹水中の penicillinase (PCase) は感染後早期には検出されず、1.5時間後に 1.5 mU/ml, 2時間後に 2.2 mU/ml, 3時間後に 2.9 mU/ml となり、6時間後まで 3.0 mU/ml 前後で推移した。一方、cephalosporinase (CSase) は感染後 0.5時間では 3.3 mU/ml, 1.5時間後に 2.8 mU/ml, 2時間後に 4.1 mU/ml, 3時間後に 7.7 mU/ml となり、以降 6時間後まで 8.0 mU/ml と高いレベルにあった (Fig. 2)。

SBT/ABPC 投与では、両菌種ともに著明に減少し、感染後 6時間に *E. coli* は 2.2×10^4 cfu/ml, *B. fragilis* は 5.8×10^5 cfu/ml となった。PCase は 6時間後まで 1.2~1.9 mU/ml の範囲で推移した。CSase は初回薬剤投与により 3.3 mU/ml から 0.3 mU/ml へと著明に低下し、感染後 3時間には 3.8 mU/ml と

上昇したが、2回目薬剤投与により再び 0.4 mU/ml へと低下した (Fig. 3)。

ABPC 投与では、*E. coli* は感染後 3時間で 1.6×10^5 cfu/ml, 6時間で 5.0×10^4 cfu/ml に減少したが、*B. fragilis* は $5 \sim 7 \times 10^7$ cfu/ml で推移した。PCase は感染後 3時間までは 1 mU/ml 以下であったが、4.5時間には 2.7 mU/ml と上昇し、治療をしない場合の活性にほぼ等しくなった。CSase は感染後 3時間に 6.0 mU/ml となったが、4.5時間 (2回目投与後 0.5時間) には 1.7 mU/ml と低下したものの以後漸増した (Fig. 4)。

SBT 投与による *E. coli* の減少はわずかでかつ一過性であり、*B. fragilis* への影響はほとんど認めなかった。一方、 β -lactamase 活性は PCase, CSase ともに感染後 2時間から 5時間の間で著明な抑制効果が観察され、CSase の抑制は一層顕著であった (Fig. 5)。

PIPC を投与した場合の 2菌種の変化は ABPC を投与したときの変化と類似していたが、感染後 3時間以降は *E. coli* の減少を認めなかった。PCase の変動も ABPC の場合と同様のパターンを示し、その活性レベルは ABPC の場合よりも高い傾向にあった。

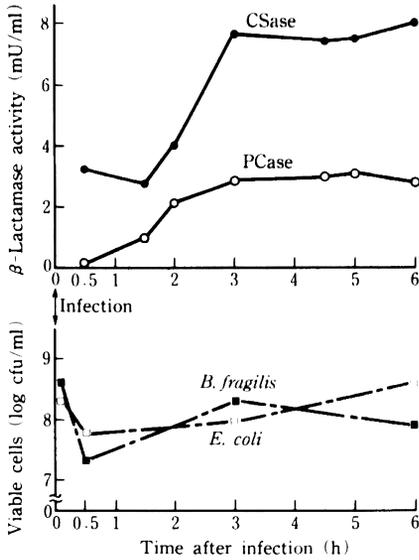


Fig. 2. β -Lactamase activity and numbers of viable cells in ascitic fluid^a of untreated mice. PCase: Penicillinase activity measured by the acidimetric method with ampicillin as a substrate.

CSase: Cephalosporinase activity measured by the acidimetric method with cephaloridine as a substrate.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse. After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid for the β -lactamase assay and viable cell count.

CSaseは感染後3時間に9.3 mU/mlとピークを示し、5時間に3.9 mU/mlと低下したが、6時間には再び4.6 mU/mlと上昇した。特に感染後1.5時間(薬剤投与後0.5時間)におけるPCaseとCSase活性は、未治療群を含めた他の4群と比較して最も高い値を示した(Fig. 6)。

III. 考 察

化膿性腹膜炎の治療に際し最も重要なことは、起因菌の排除と抗菌薬の適切な投与である¹⁻³。化膿性腹膜炎ではほとんどが複数菌感染であり¹²⁻¹⁴、*B. fragilis*などが産生する強力な β -lactamaseが β -lactam 剤を分解し、*E. coli*などの強毒菌の増殖を助けるといった間接的病原性¹⁵の見地から、臨床検体における β -lactamase活性の測定は大きな意義があ

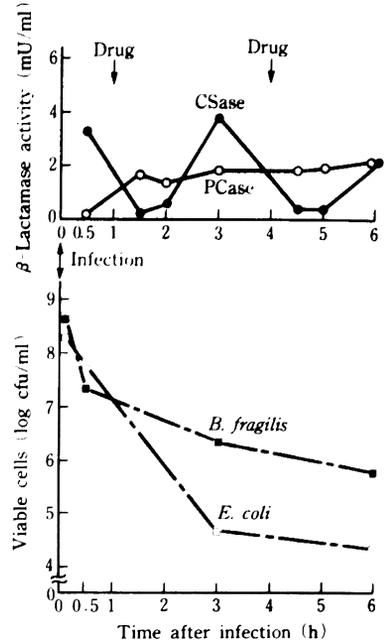


Fig. 3. β -Lactamase activity and numbers of viable cells in ascitic fluid^a of mice treated with 30 mg/kg of subactam/ampicillin.

PCase: Penicillinase activity measured by the acidimetric method with ampicillin as a substrate.

CSase: Cephalosporinase activity measured by the acidimetric method with cephaloridine as a substrate.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse. After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid for the β -lactamase assay and viable cell count.

る。Soriano¹⁶らは、ラットにおいて*E. coli*と*B. fragilis*の腹腔内感染モデルを作成し、cefotaxime (CTX), aztreonam, gentamicinの3種の抗菌薬で治療実験をした。その結果、CTX投与群では混合感染の死亡率が有意に上昇し、その理由を*B. fragilis*の産生する β -lactamaseであろうと推察している。

またMinami¹⁷らは*Enterobacter cloacae*や*Proteus vulgaris*による腹腔内感染モデルで投与した β -lactam 剤が β -lactamaseにより不活化されるとしている。

我々は化膿性腹膜炎の起因菌としては最も多い*E.*

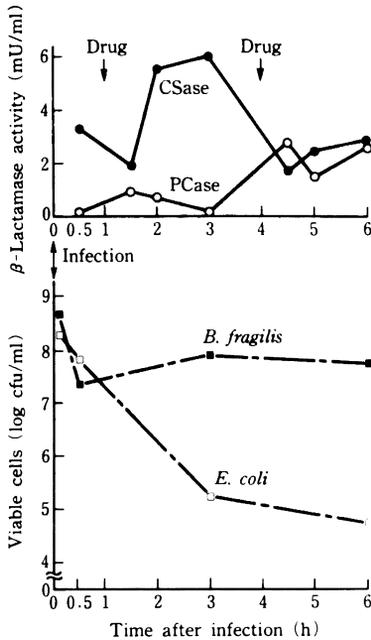


Fig. 4. β -Lactamase activities and numbers of viable cells in ascitic fluid^a of mice treated with 30 mg/kg of ampicillin.

PCase: Penicillinase activity measured by the acidimetric method with ampicillin as a substrate.

CSase: Cephalosporinase activity measured by the acidimetric method with cephaloridine as a substrate.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse. After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid for the β -lactamase assay and viable cell count.

coli と *B. fragilis* の混合感染モデルを用いて腹水中 β -lactamase が腹膜炎の治療におよぼす影響を観察し、間接的病原性を捉えようと試みた。

マウスにおける *E. coli* と *B. fragilis* の混合感染モデルについては、東¹⁶⁾らは腹水中細菌数と血中細菌数を24時間にわたり観察し、腹腔内に細菌が散布されてから1時間後にはすでに敗血症状態にあると指摘している。抗菌薬非投与時には腹水中の *E. coli* は感染後2時間でいったん減少するものの、その後は漸増し、*B. fragilis* は時間とともに増加している。我々の実験でも、未治療群では感染後0.5時間には両菌種と

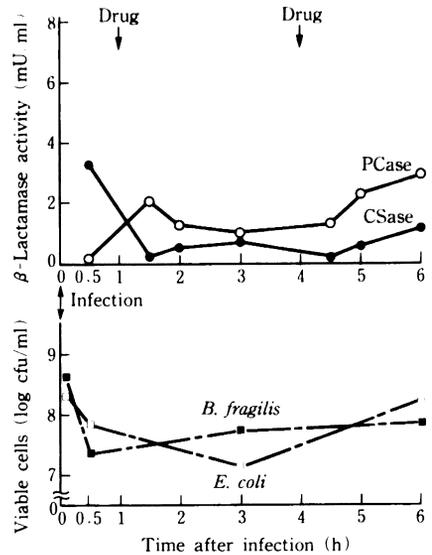


Fig. 5. β -Lactamase activity and numbers of viable cells in ascitic fluid^a of mice treated with 30 mg/kg of subactam.

PCase: Penicillinase activity measured by the acidimetric method with ampicillin as a substrate.

CSase: Cephalosporinase activity measured by the acidimetric method with cephaloridine as a substrate.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse. After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid for the β -lactamase assay and viable cell count.

も減少し、*E. coli* はその後漸増、*B. fragilis* は3時間以降はほぼ平衡状態を保った。

今回使用した薬剤はすべて感染時には非感染時よりも腹水中移行が良好であった。その理由の一つとして、感染巣における血管壁の拡張による薬剤透過性の亢進が考えられる。*In vitro* ではABPCもPIPCも *E. coli* と *B. fragilis* に対する抗菌力にほとんど差がないのに対し、治療実験におけるED₅₀の違いは腹水移行の違いが原因であろう。この点からも、化膿性腹膜炎の治療に際し、抗菌力はもちろん腹水移行のよい薬剤を選択することは非常に重要である。また、薬剤投与後0.5時間の腹水中濃度は、SBT/ABPC以外では1回目(1.5時間)より2回目(4.5時間)の方が明らかに低値であった。SBT/ABPC投与で薬剤濃度

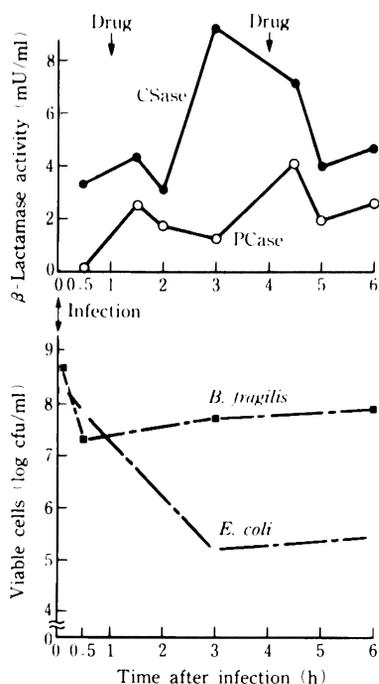


Fig. 6. β -Lactamase activity and numbers of viable cells in ascitic fluid^a of mice treated with 30 mg/kg of piperacillin.

PCase: Penicillinase activity measured by the acidimetric method with ampicillin as a substrate.

CSase: Cephalosporinase activity measured by the acidimetric method with cephaloridine as a substrate.

^a Two ml of 0.4 mM Na phosphate buffer saline (PBS) was injected into the peritoneal cavity of each mouse. After gentle massage of the mouse abdomen, PBS was recovered and used as ascitic fluid for the β -lactamase assay and viable cell count.

が低下しなかったのは、PCaseもCSaseもSBTによって阻害されているとともに、菌数が著明に減少しているため腹腔内膿瘍の形成が少なく薬剤の腹水移行が良好であったためと考えられる。またABPCやPIPCでは、感染後4.5時間にPCaseもCSaseも上昇しており、これが薬剤不活に影響している可能性も充分考えられる。時間経過につれて薬剤の腹水移行が低下することは、膿瘍壁の形成が大きな原因の1つと考えられ、臨床における化膿性腹膜炎でも同様のことが推察される。さらに、感染症に対する初期治療にお

いて、感染巣が除去できていない場合は予想される病原菌に抗力のある抗菌薬の十分な投与と、できるだけ速やかな感染巣除去の重要性が示唆される。

治療を行わなかったマウスの腹水中 β -lactamase活性をみると、CSaseが感染後1.5時間から急激に上昇するのは、*B. fragilis*が増加している影響が大きいと考えられる。しかし、感染後6時間には*B. fragilis*がやや減少しているにもかかわらずCSaseは減少していないことから、感染初期にマウスの自己免疫力によって死滅した菌の菌体内酵素が遊離した可能性も考えられる。感染後3時間でPCaseとCSaseがほぼ平衡に達するのは菌数の変化、すなわち腹腔内における菌の増殖と死滅がほぼ平衡状態に達したためであろう。

SBT単独投与あるいはSBT/ABPC投与ではSBTの存在する時間帯ではPCaseよりもCSaseを強力に阻害した。SBTは本来PCaseを強く、CSaseを中等度に阻害する作用をもつ¹⁹⁾とされているが今回は逆の結果であった。この理由は、腹水採取直後に室温で β -lactamase活性を測定し、腹水をインキュベートしていなかったこと、治療薬と β -lactamase活性測定用の基質(ABPC)が同じであり腹水中に移行したABPCが影響したことなどが考えられるが詳細は不明である。

SBTもABPCもそれぞれ単独では両菌種を同時に減少させることはできなかったが、SBT/ABPC投与群では*B. fragilis*に対するMIC以下の薬剤濃度しか腹水中に検出されないにもかかわらず、両菌種とも明らかに減少した。この原因としては、SBT/ABPC投与時はそれぞれの単独投与時に比較して感染早期に*E. coli*が著明に減少しており、それにともなって*B. fragilis*の増殖も抑制された可能性も考えられる。この事実はSBT/ABPCの*in vivo*での有効性を表わしたものであり、SBT/ABPCはすでに外科領域感染症においてもその有効性が報告されている²⁰⁾

ABPCとPIPCの単独投与では、PCaseのピークは感染後4.5時間、CSaseのピークは感染後3時間であるが、全体的にPIPC投与のほうが β -lactamase活性は高値を示している。これはPIPCの腹水移行が低濃度であったため、CSaseが誘導されたことが原因かも知れない。腹水中生菌数は類似した変化を示しているのにED₅₀が異なるのは、この β -lactamase活性および薬剤の腹水移行の差が関与している可能性がある。

また、一度抗菌薬を使用した場合、菌数は減少しても溶菌によって菌体内の β -lactamaseが遊離し、一

過性に増加することを知っておくことが重要であり、その後の薬剤の投与法や投与量についても充分考慮すべきである。

腹水中からの ABPC の消失速度は、SBT/ABPC 投与が ABPC 単独投与よりも遅く、これは SBT による β -lactamase 阻害効果によるものと推察される。しかし、SBT/ABPC 投与では腹水中 ABPC 濃度が高く溶菌が高度であったため PCase は ABPC 単独投与よりも高値を示しており、ABPC の消失速度に関しては β -lactamase 以外の要因が存在する可能性がある。すなわち、腹水中の菌数や重症度に応じて腹膜の薬剤透過性に差があったり、PCase が (2 mU/ml 前後) 低値であれば ABPC の pharmacokinetics にはあまり影響がないのかも知れない。

以上の結果から、*E. coli* など強毒菌が、 β -lactamase 高度産生菌と共存した場合の薬物治療において、 β -lactam 剤が不活化されその抗菌力を失う経過を経時的に観察できた。さらに、 β -lactamase を阻害することによってその薬剤が抗菌力を維持し、治療成績をより一層向上させることを証明した。

本論文の要旨は、第 39 回日本化学療法学会総会 (1991, 千葉) にて発表した。

文 献

- 1) 谷村 弘, 石本喜和男: 外科感染症の最近の動向と対策. 外科治療 61 (増刊): 250~253, 1989
- 2) 谷村 弘: 今日の化学療法剤の使い方, 一ペニシリン系・セフェム系注射薬一. 外科診療 32: 610~616, 1990
- 3) 谷村 弘: 臨床からみた最近の化学療法のポイント: 外科感染症. Kolben Medica 10: 17~23, 1989
- 4) 横田 健: β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性. モダンメディア 24: 360~377, 1978
- 5) Rubin F A, Smith D H: Characterization of R factor β -lactamases by the acidimetric method. Antimicrob. Agents Chemother. 3: 68~73, 1973
- 6) 道浦 準, 谷村 弘, 坂本幸具, 佐々木政一, 石本喜和男, 谷口勝俊, 内山和久, 寺下史朗, 児玉悦男, 小林康人, 一宮源太, 徳川佐奈美, 松永敏幸, 小川正俊, 川崎賢二: 腹水中 β -lactamase 活性の測定法. 日本外科感染症研究, 第 3 巻, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1991, p 300~305
- 7) 下岡新雄, 伊東正実, 松本京子, 新美博仕, 松永敏幸, 川崎賢二: 高速液化クロマトグラフィー電気化学検出法及び bioassay 法による血中 sulbactam 濃度の高感度測定法. Chemotherapy 36: 81~89, 1988
- 8) 日本抗生物質医薬品基準解説, アンピシリン. 薬業事報社, 東京, 1986, p 465~466
- 9) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀雄, 渡辺泰雄, 松原 信之, 中川三千子, 金川心子: T-1220 の吸収, 排泄および体内分布. Chemotherapy 25: 801~809, 1977
- 10) 坂本幸具: 胆道感染症における胆汁中 β -lactamase 活性測定の意味. 和歌山医学 42: 27~38, 1991
- 11) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 12) 谷村 弘, 日笠頼則, 小林展章, 加藤仁司, 関谷 司, 佐藤友信, 斉藤 徹, 吉田圭介, 黄 文芳, 端野博康, 中村正則, 出口浩一: 化膿性腹膜炎に対する Cefotetan と Cefmetazole の二重盲検法による比較試験. Jap. J. Antibiotics 36: 369~390, 1983
- 13) 谷村 弘, 小林展章, 関谷 司, 向原純雄, 瀬戸山元一, 日笠頼則, 片岡三朗, 佐藤友信, 伊豆蔵健, 藤井一寿, 安本 裕, 薄井裕治, 村山保雄: 腹膜炎の化学療法 (II), 一とくに Ceftizoxime による臨床効果について. Chemotherapy 28: 533~541, 1980
- 14) Brook I: A 12 year study of aerobic and anaerobic bacteria in intra-abdominal and postsurgical abdominal wound infections. Surg. Gynecol. Obstet. 169: 387~392, 1989
- 15) Maddocks J L, May J R: "Indirect pathogenicity" of penicillinase-producing enterobacteria in chronic bronchial infections. Lancet 1: 793~795, 1969
- 16) Soriano F, Ponte C, Santamaria M, Castilla C: Effect of *Bacteroides fragilis* on mortality induced by *Escherichia coli* in an experimental infection treated with cefotaxime, aztreonam or gentamicin. J. Antimicrob. Chemother. 23: 383~388, 1989
- 17) Minami S, Araki H, Watanabe Y, Yasuda T, Takai A, Saikawa I, Mitsunashi S: Reduction of cephamycin concentrations at the infection site in mice with experimental peritoneal infection caused by cephalosporinase-producing bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 376~378, 1986
- 18) 東 芳典, 谷村 弘, 青木洋三, 石井孝弘, 五井仁: 化膿性腹膜炎における抗生剤の体内濃度と除菌効果に関する実験的研究 (I). 日本外科宝函 58: 445~451, 1989
- 19) 五島瑛智子, 小川正俊, 金子康子, 辻 明良, 宮崎修一, 桑原章吾: β -lactamase inhibitor である Sulbactam と Cefoperazone の併用による *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用. Chemotherapy 32: 38~50, 1984
- 20) 酒井克治, 上田隆美, 森本 健, 藤本幹夫, 森本讓: 外科領域における Sulbactam・Ampicillin の臨床使用成績. Chemotherapy, 36: 334~339, 1988

β -LACTAMASE ACTIVITIES IN ASCITIC FLUID ON EXPERIMENTAL
INTRAPERITONEAL INFECTION IN MICE

—COMPARATIVE STUDY WITH VIABLE BACTERIAL COUNTS AND
DRUG CONCENTRATIONS IN ASCITIC FLUID—

Jun Michiura, Hiroshi Tanimura and Yukitomo Sakamoto

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College,
7 Bancho 27, Wakayama City, Japan

We evaluated the protective effect of sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), ampicillin (ABPC), sulbactam (SBT) and piperacillin (PIPC) against experimental peritonitis in mice caused by intraperitoneal inoculation of *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. β -Lactamase activity, viable bacterial counts and drug concentrations in ascitic fluid of infected mice were determined in the time course of infection. The results obtained are summarized as follows.

- 1) The ED₅₀ values of SBT/ABPC and ABPC were 14.0 mg/kg and 23.0 mg/kg, but 50% of mice were not cured by 70 mg/kg administration of SBT or PIPC.
- 2) Without antimicrobial therapy, the β -lactamase activity of both penicillinase (PCase) and cephalosporinase (CSase) reached a plateau at 3 h after infection. SBT at a dose of 30 mg/kg demonstrated no reduction of the pathogens' viable bacterial counts, but showed a remarkable inhibition of β -lactamase activity, especially against CSase.
- 3) When each test drug was administered to infected mice, its concentration in ascitic fluid was ten times higher in infected than in normal mice.
- 4) Drug peak concentrations in ascitic fluid after the second administration of ABPC or PIPC proved to be almost half of the first peak level. On the other hand, in the case of SBT/ABPC, there was little difference in ABPC level after the first and second administrations. We conclude that the protective effect of SBT/ABPC mainly results from the inhibition of β -lactamases in ascitic fluid, and probably these β -lactamases partly cause the "indirect pathogenicity"